

0 718 850-1

На правах рукописи

ПОЛОЗОВ ГЛЕБ ЮРЬЕВИЧ

**СИЛИКАТНЫЕ БАКТЕРИИ:
БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И
ГИПОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ**

специальность
03.00.07 - микробиология



Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань, 2000г.

Работа выполнена в лаборатории кафедры генетики
Казанского государственного университета

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор Б.И. Барабанщиков
кандидат биологических наук, доцент С.В. Малков

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор Р.П. Наумова
Доктор медицинских наук, профессор В.В. Семенов

Ведущая организация:

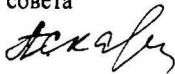
Институт биохимии и биофизики КНЦ РАН

Защита диссертации состоится 23.11. 2000г. в 14⁰⁰
на заседании Диссертационного совета К 053.29.19. при Казанском
государственном университете имени В.И. Ульянова- Ленина по адресу: 420008,
Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного
университета

Автореферат разослан 21.10. 2000г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
к.б.н., доцент А.Н. Аскарова



НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000947809



Природные штаммы силикатных бактерий используют в сельском хозяйстве как бактериальные удобрения (Александров, 1950). Весьма перспективным может оказаться использование штаммов данной группы микроорганизмов в качестве гипосенсибилизирующих агентов для плодово-ягодных и овощных культур. Подобный эффект обработок силикатными бактериями был обнаружен на кафедре генетики Казанского государственного университета (Malkov et al., 1995).

Актуальность. Широкое распространение аллергических заболеваний, в частности на продукты растительного происхождения (Marcus et al., 1995), заставляет много средств и времени уделять исследованию причин, вызывающих аллергические реакции и искать эффективные методы борьбы с ними. Несмотря на успехи современной медицины, решение проблемы борьбы с аллергическими заболеваниями еще не найдено. Прием некоторых бактериальных препаратов, например бактисубтила, может приводить к значительному ослаблению аллергических реакций. В последние годы накопилось немало данных, свидетельствующих о том, что бактерии-пробиотики способны модулировать иммунный ответ, вызывая гипосенсибилизирующие эффекты (Pelto et al., 1998, Murosaki, Yamamoto, 1998). Согласно полученным ранее результатам (Malkov et al., 1995), мы предполагаем, что введение в практику сельского хозяйства некоторых штаммов бактерий может привести к нормализации обмена веществ в растениях, снижению концентрации защитных белков, являющихся главными растительными аллергенами, накоплению в растениях модуляторов иммунного ответа и гипосенсибилизирующему эффекту.

Научная новизна работы. Использование силикат разрушающих бактерий для снижения сенсibilизирующей активности сельскохозяйственных растений предлагается нами впервые. Принципиальным является также подход к выяснению роли биологически активного кремния, что позволит расширить представления о механизмах функционирования и регуляции генома.

Цель нашей работы заключалась в создании методических основ для выявления и изучения бактерий, обладающих гипосенсибилизирующим действием.

Задачами работы явились:

1. Выделение природных штаммов силикат разрушающих бактерий и исследование их свойств.
2. Проверка токсических и генотоксических характеристик выделенных штаммов.
3. Обработка растений бактериальными культурами для изучения их влияния на морфофизиологические признаки.
4. Изучение потенциальных возможностей штаммов силикатных бактерий оказывать гипосенсибилизирующее действие.

Народнохозяйственное значение данной работы заключается в получении сельскохозяйственных продуктов с пониженной сенсibilизирующей

активностью, пригодных к употреблению больными с выраженной пищевой аллергией.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выделенные и изученные штаммы “силикатных бактерий” способны разрушать силикатные минералы, стимулировать рост ряда ауксотрофных газонов *B. subtilis* 168М, не проявляют генотоксического действия.
2. Культуры силикатных бактерий, при обработках ими ряда цветковых растений, индуцируют у них образование морфозов типа фасциаций и атаксизмов.
3. Силикатные бактерии, при обработках ими ряда сельскохозяйственных растений, проявляют гипосенсибилизирующий эффект.

Апробация работы: Результаты работы были представлены на 3-й Республиканской научно-технической конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 1997), на 1-й научно-практической конференции, посвященной 80-летию БГФ КГПУ (Казань, 1998), на научных конференциях КГУ (1993-1999г), 4 съезде общества физиологов растений (Москва, 1999), научно – практической конференции «Биотехнология – 2000» (Пушино, 2000). Работа выполнялась при поддержке ФЦП “Интеграция” (контракт №241.2) и фонда НИОКР РТ (договор № 04-13-99).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

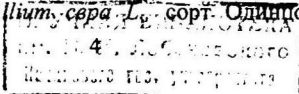
В работе использованы штаммы микроорганизмов рода *Bacillus*, взятых из лабораторного музея кафедры генетики КГУ, а также выделенные нами из почв штаммы бактерий, разрушающих силикаты.

Штаммы силикат разрушающих бактерий (*B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5, KU6) выращивали на жидких и агаризованных средах Александрова (Александров, 1953). В качестве полноценной питательной среды использовали мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА).

Количественный анализ содержания подвижной формы кремния в культуральной жидкости силикатных бактерий проведен с.н.с. группы элементного анализа ИОФХ им. Арбузова (Казань), Ю.П. Ходаревым, методом лазерной масс спектроскопии (LIMS, e-mal-2).

Бациллы выделяли из почвенных проб (Сайманова, Захарова, 1980). Фильтрат высевали на чашки Петри с МПА и характерные слизистые колонии затем рассевали на агаризованную среду Александрова без растворимых солей калия, но содержащих ортоклаз ($KAlSi_3O_8$) и на среду Спицайзена (Бациллы, 1992), содержащую в верхнем слое (5-6мл) 0,1% двуокиси германия. Колонии силикат разрушающих бактерий образовывали на агаре с германием прозрачные бляшки - зоны растворения двуокиси германия.

Определение токсичности и генотоксичности суспензионных культур проводили в тесте Эймса (Ames et.al., 1973); цитогенетических тестах на клетках пророщенных семян лука - *Allium cepa* L. сорт. Одиновцев, скерде- *Crepis*



capillaris (Паушева, 1984); исследовании на дафниях - *Daphnia magna* (Исакова, Колосова, 1989); лабораторных крысах (белых и породы "Август"), полученных из питомника "Столбовая" Московской области (Никитин, 1949, Думкин, 1980); плодовых мушках *Drosophila melanogaster* линий *Normal* (Медведев, 1968).

Биологическую активность бактериальных культур оценивали по действию на количественные и морфологические признаки цветковых растений. В качестве тест-объектов использовали: гречиху *Fagopyrum esculentum* Moench. сортов Казанская Крупнозерная, Каракитянка, Медовая; просо *Panicum sp.* сорт Казанское 61; пшеницу *Triticum aestivum var. muticum* яровая сорт Энита; горох посевной *Pisum sativum L.*, сортов Татарстан, Казанец, Адыгейский. Семена культур предоставлены НИО "Нива Татарстана". Кроме того, проводили наблюдение за следующими плодово-ягодными и дикорастущими культурами: космеей *Cosmos bipinnatus Cav.*; календулой *Calendula officinalis L.*; подорожником *Plantago major L.*; садовой земляникой *Fragaria magna Thuill.*; черной смородиной *Ribes nigrum L.*; - яблоней (*Malus sp.*); топинамбуром (*Helianter sp.*); адонисом летним (*Adonis aestivalis*); тыквенными (огурцы, кабачки сем. *Cucurbitaceae*); лилейными (лилия белая садовая сем. *Liliaceae*); адвентивной полынью Сиверса (*Artemisia sieversiana Willd.*).

Обработку деленок бактериальной культурой проводили разбрызгиванием по площади. Концентрация бактерий достигала в не разведенных, 100% суспензиях титра 10^9 (норма обработки - 1 л/м^2), а в разведенных, 1% - 10^7 кл/мл (при 100- кратном разведении). Опрыскивания проводили еженедельно в течение мая - июня.

Оценка сенсibiliзирующих свойств растительных продуктов проводилась совместно с кафедрой детской аллергологии КГМА под руководством д.м.н., проф. А.М. Потемкиной на базе детской аллергологической больницы №7. Использовались стандартные аллергологические тесты: ОПТ-оральный провокационный тест, ППТ- подязычный провокационный тест, КСП- кожная сакирификационная проба, Прик-т - кожный уколчатый тест, РДТК- реакция деструкции тучных клеток крыс

В работе применяли методы математической статистики (Плохинский, 1970, Лакин, 1990), а также программное обеспечение Statgraph 3.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение и культуральные характеристики штаммов

Некоторые морфологические и физиолого-биохимические признаки трех штаммов силикатных бактерий приведены в таблице 1.

В 1996г. из почв Татарии (с.Чупаево Альметьевского района) нами выделены штаммы: *B. mucilaginosus KU5* и *KU6*. Идентификация штамма *KU1* как *B. oligonitrophilus* была проведена ранее (Малков, Барabanчиков, 1991).

Отличительной чертой исследуемых микроорганизмов явилась их способность расти на средах без растворимого калия, но с силикатными минералами, содержащими калий: ортоклазом, микроклином или биотитом.

Способность растворять кремнийсодержащие минералы и извлекать калий для своих метаболических нужд позволила отнести данные штаммы к “силикатным” (Александров, 1953). Поскольку характерной особенностью процесса биodeградации силикатных минералов является освобождение кремния в виде растворимых соединений, нам предстояло оценить масштабы их аккумуляции в культуральных жидкостях изучаемых бацилл. Полученные нами результаты (табл. 2), несмотря на различие применяемых методов определения, соответствуют результатам, полученным ранее (Белканова и др., 1985). Аккумуляция подвижных соединений кремния штаммом сенной палочки *B. subtilis* var. *niger* KU3 (в количестве 28 мг Si/l) соответствует высказанной ранее (Мишустин и др., 1981) гипотезе о том, что разрушать силикаты способны многие микроорганизмы. Однако принципиальным отличием может быть то, что силикатные бактерии могут инициировать этот процесс в бескалийных средах, тогда как для вышеупомянутого штамма *B. subtilis* var. *niger* KU3 в среде необходим доступный калий.

Штамм *B. mucilaginosus* KU5 при культивировании в жидкой среде Александрова синтезировал большое количество слизи, так что среда имела консистенцию киселя. На средах МПА колонии имели гладкую поверхность, круглую форму, кратерообразный профиль, ровный край и пастообразную консистенцию. Окраска при старении культуры становилась более интенсивной, чем на среде Александрова. Микрокопирование показало наличие мелких палочек.

Штамм *B. mucilaginosus* KU6 при культивировании на агаризованной среде Александрова давал слизистые колонии диаметром 2-3 мм, светло-желтой окраски. На средах МПА, по мере старения, колонии приобретали белый цвет. В остальном (форма, профиль, край, поверхность, консистенция колоний) свойства совпадали с таковыми у штаммов *B. mucilaginosus* KU5, *B. oligonitrophilus* KU1. При росте на агаризованной среде Александрова с низкой буферной емкостью, вокруг колоний образовывались окрашенные зоны диаметром до 4мм. При культивировании на жидкой среде с низкой буферной емкостью, розовый пигмент образовывался в районе полосы слизи, на границе раздела фаз вода-воздух и через двое суток культивирования вся жидкость приобретала розовую окраску. При продолжительной инкубации при комнатной температуре, через 2 недели жидкость приобрела малиновый цвет, а через 2 месяца - свекольную.

Проведенные исследования показали, что штаммы *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5, KU6 имеют сходные спектры чувствительности - устойчивости к антибиотикам, отличающиеся от таковых у штаммов *B. subtilis* var. *niger* KU3, *B. mesentericus* BKMB-74, *B. subtilis* 168M.

Характерной особенностью данных штаммов является их способность выделять в среду биологически активные соединения. Все три силикатных штамма хорошо стимулировали рост газона сенной палочки (*B. subtilis* RUB 830), ауксотрофного по тимину, несколько слабее - ауксотрофных по никотиновой кислоте (*B. subtilis* 5M) и пуриновым основаниям (*B. subtilis* BD46) штаммов.

Таблица 1

**Некоторые морфологические и физиолого-биохимические
признаки силикатных бактерий**

<i>Признаки</i>	<i>B. oligonitrophilus</i> <i>KU1</i>	<i>B. mucilaginosus</i> <i>KU5</i>	<i>B. mucilaginosus</i> <i>KU6</i>
Окраска по Грамму	+	+	+
Разрушение силикатов	+	+	+
Выделение тимина	+	+	+
Рост на крахмале	-	+	-
Каталаза	+	+	+
Утилизация цитрата Na	+	+	+
Утилизация цитр. Na с глюкозой	-	+	-
Утилизация малоната Na	-	+	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	+
Фенилаланиндезаминаза	-	-	+
Разжижение желатины	-	+	-
Утилизация глюкозы	+	+	+
Утилизация лактозы	+	+	-
Утилизация сахарозы	+	+	+
Утилизация маннита	+	+	+
Утилизация инозита	+	+	+
Утилизация сорбита	+	+	+
Утилизация арабинозы	+	+	+
Утилизация мальтозы	+	+	+
pH (стационар)	6.0-6.1	7.0-7.1	7.0-7.1

Таблица 2

Количество растворенного кремния в культуральных жидкостях бацилл

Штамм	Количество растворенного кремния, мг/л культуральной жидкости
<i>B. mucilaginosus</i> ИНМИ-14*	до 36
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1	25.5
<i>B. mucilaginosus</i> KU5	25.9
<i>B. mucilaginosus</i> KU6	28.7
<i>B. subtilis</i> var. <i>niger</i> KU3	28

Примечание: данные, помеченные знаком * взяты из работы Белкановой и др., 1985.

2. Проверка токсичности суспензионных культур силикатных бактерий

Тест Эймса. Полученные результаты показывают, что добавление культуральных жидкостей в используемых концентрациях не снижает жизнеспособности *S. typhimurium*. Мутагенного эффекта на данной системе не показано ни для одного из опытных вариантов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние культуральных жидкостей на частоту *His*⁺ реверсий и жизнеспособность штамма *S. tiphimurium* BA 13.

Вариант	X	Варианса	Fs	Жизне- способность
Контроль	58.75	60.2	-	192.6+3.2
Контроль с мутагеном	330	356.2	5.9*	96.4+4.2
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1-10мкл	54.33	28.4	2.12	183.5+2.4
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1-30мкл	54.3	23.1	2.6	190.3+1.5
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1-60мкл	42.2	19.3	3.12*	190.6+1.8
<i>B. mucilaginosus</i> KU5-10мкл	60.7	48.8	1.23	191.5+2.1
<i>B. mucilaginosus</i> KU5-30мкл	58.8	81.6	1.36	191.3+5.1
<i>B. mucilaginosus</i> KU5-60мкл	52	37.5	1.6	192.2+1.6
<i>B. mucilaginosus</i> KU6-10мкл	53.3	58.5	1.03	191.5+3
<i>B. mucilaginosus</i> KU6-30мкл	41	17.5	3.44*	196.3+3.1
<i>B. mucilaginosus</i> KU6-60мкл	48.9	29.9	2.01	203.5+3.2
<i>B. subtilis</i> v. <i>niger</i> -10мкл	45.8	31	1.94	194+5.3
<i>B. subtilis</i> v. <i>niger</i> -30мкл	46.8	9.9	6.1*	192+3.8
<i>B. subtilis</i> v. <i>niger</i> -60мкл	40.4	4.03	14.7*	188.8+2.9
Контроль	54.6	78.4	-	192.6+3.2
<i>B. subtilis</i> -10мкл	58.1	30.8	2.55	191+2.4
<i>B. subtilis</i> -30мкл	58.8	94.5	1.2	184.8+6.4
<i>B. subtilis</i> -60мкл	56.7	61.6	1.27	197.3+2.8

Примечание: X- среднее арифметическое количество колоний-ревертантов на чашке Петри, n=12, Fs- значение отношения вариантов по Фишеру, значимые выделены, Жизнеспособность - среднее количество колоний, выросших на чашке с полноценной средой, контроль с мутагеном - инкубирование с 2-нитрофлуореном 1.25 мкг/чашку.

Цитогенетические тесты проводился нами на пророщенных семенах лука и скерды. Показано, что при снижении концентрации бактериальной суспензии, равно как и среды Александра, митотический индекс клеток корешков лука повышался, принимая наибольшие значения при 0.1% концентрации.

Достоверных отличий между вариантами по учтенным абберациям (фрагментам, мостам, отстающим хромосомам) не выявлено, генотоксический эффект не показан (табл. 4).

Цитогенетический тест на корешках скерды проводился нами для всех трех изучаемых штаммов силикатных бактерий (табл. 5). В целом картина действия культур была аналогична предыдущим. При 1 и 0.1% (10^6 и 10^5 кл/мл) концентрациях культур наблюдалось увеличение митотического индекса от 2.6 до 6.5%. Достоверных отличий от контроля по учтенным абберациям не обнаружено.

Таблица 4

Учет хромосомных aberrаций в клетках корешков лука

	Дист. вода	Штамм 10%	Среда 10%	Штамм 1%	Среда 1%	Штамм 0.1%	Среда 0.1%
анафаз	288	440	298	486	559	474	490
абerr.	6	6	4	12	10	5	13
%	2.23	1.36	1.34	2.45	1.79	1.05	2.65
td1	-	0.84	0.81	0.2	0.42	1.19	0.37
td2	-	0.02		0.7		1.85	

Примечание: анафаза- число исследованных метафаз, абerr.- число метафаз с aberrациями, td1- сравнение по Стьюденту с дист. водой, td2 - сравнение вариантов штамм - среда одной концентрации, учет проводился для растений, обработанных штаммом *B. oligonitrophilus* KU1.

Таблица 5

Митотическая активность клеток корешков *Crepis capillaris* при их проращивании с добавлением культур силикатных бактерий

Вариант	N	Mt+m	td	A	A%
Контроль	694	7.4 \pm 0.55		0	0
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1- 10%	353	5.4 \pm 0.45	2.7*	0	0
<i>B. mucilaginosus</i> KU5 -10%	920	7.5 \pm 0.3	0.13	0	0
<i>B. mucilaginosus</i> KU6 -10%	1064	7.5 \pm 0.2	0.11	0	0
Контроль	1768	7.5 \pm 0.2		1	1.4
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1- 1%	2097	10.1 \pm 0.36	6.3*	2	1.7
<i>B. mucilaginosus</i> KU5 -1%	2300	14 \pm 0.22	20.4*	1	0.7
<i>B. mucilaginosus</i> KU6 -1%	1424	11 \pm 0.27	10.5*	4	3.8
Контроль	1894	7.7 \pm 0.14		0	0
<i>B. oligonitrophilus</i> KU1-0.1%	2094	10.9 \pm 0.26	12.3*	0	0
<i>B. mucilaginosus</i> KU5 - 0.1%	2165	11.7 \pm 0.19	16.1*	1	0.53
<i>B. mucilaginosus</i> KU6 - 0.1%	2147	12.1 \pm 0.16	18.6*	0	0

Примечания. N- общее число микроскопированных клеток, Mt+m- митотический индекс в % со своей ошибкой, td- разница между контролем и опытом, значимые отличия выделены знаком *, A- число и A%- процент клеток с aberrациями.

Токсичность на дафниях определялась по выживаемости рачков. Во всех опытных вариантах (было испытано 6 различных концентраций суспензий *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5, KU6: 0.5, 1, 2, 3, 4 и 5 [$\cdot 10^6$] клеток / мл.), а также в контрольных стаканах смертность среди дафний отсутствовала, что свидетельствует о полной токсикологической безопасности (безвредности) испытанных концентраций суспензионных культур для дафний.

Не было показано и токсического действия культур силикатных бактерий в экспериментах на дрозофилах линии Normal по учету вылета имаго.

Действие на лабораторных крыс культуры штамма *B. oligonitrophilus* KU1 рассматривалось нами для учета возможного токсического действия суспензий на млекопитающих при пероральном приеме.

За время приема штамма беременными крысами отрицательного действия на них выявлено не было. Животные имели хороший внешний вид, обычное поведение, нормальный аппетит. Сроки беременности, равно как и количество крысят в помете соответствовали стандартам. В дальнейшем велись наблюдения за новорожденными крысятами до их полового созревания. Данные по весу соответствовали норме (Трахенберг и др., 1991).

Однако, были отмечены различия в весе самцов опытной и контрольной групп. Известно, что самцы млекопитающих более чувствительны к действию токсических веществ, чем самки, и возможно данная доза препарата явилась для них слаботоксичной, тогда как для самок она является безвредной. С другой стороны, согласно гипотезе ювенилизации генома, такое действие бактериальной суспензии может отражать не токсический, а модулирующий эффект микробных метаболитов, возможно биологически активных соединений кремния. Достоверных отличий по весу у самок контрольной и опытной групп не наблюдалось.

Показатели крови крыс были проанализированы у животных, принимавших перорально культуры штаммов *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5, KU6, *B. subtilis* 168M. Полученные данные представлены в таблице 6.

Препараты *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5 не показали отрицательных эффектов в данном тесте и их пероральный прием в указанных дозах для крыс безвреден.

Увеличение уровня эозинофилов у крыс, получавших суспензии *B. mucilaginosus* KU6, может быть связано с сенсибилизирующим эффектом перорального приема данных суспензий. Отмечено также сниженное, по сравнению с контролем, количество лимфоцитов и увеличенное количество сегментоядерных нейтрофилов (первый месяц приема) в лейкоформуле крови. По сравнению с формулой крови крыс, получавших суспензию штамма *B. subtilis* 168M, количество лимфоцитов снизилось, СОЭ увеличилась, уровень гемоглобина понизился. Данные факты можно рассматривать как показатель слабой токсичности или аллергенности штамма *B. mucilaginosus* KU6 для лабораторных крыс.

3. Действие бактерий на растения

Изучение variability количественных признаков сельскохозяйственных растений под действием интенсивных бактериальных обработок ведется нами в течение ряда лет. Ярко выраженного стимулирующего действия интенсивных обработок бактериями на количественные признаки, за редким исключением, замечено не было. Во многих случаях показано

увеличение степени изменчивости признака под действием бактериальных обработок.

Таблица 6

Основные показатели крови крыс,
получавших перорально бактериальные культуры

	Hb g%	COЭ mm/h	Er *10 ⁶ k/mkl	Lei *10 ³ k/mkl	Лейкоформула % Эозин. Палоч. Сегм. Лимф. Мон.				
1. Контроль 1, n=10									
X	9.98	2.2	6.4	17.7	0.8	1.5	15	79.7	3.1
m	0.84	0.61	0.21	1.66	0.25	0.66	1.9	1.94	1.7
2. Контроль 2, n=10									
X	10.9	3.9*	6.49	22.1*	2.9*	1.1	17.35	76.2	1.8
m	0.4	0.73	0.1	1.03	0.57	0.35	1.61	2.1	0.57
4. Месяц приема <i>B. oligonitrophilus</i> KU1, n=5									
X	11.25	3.1	7	21	2.25	1.2	20.55	74	1.75
m	0.5	0.41	0.38	2.4	0.75	0.49	1.94	2.64	0.48
5. Три месяца приема <i>B. oligonitrophilus</i> KU1, n=5									
X	11.15	2.75	6.88	20.2	2.75	0.2*	24.5	66.25	1.25
m	0.48	0.75	0.34	2.6	1.1	0.2	5.2	9.6	0.25
6. Месяц приема <i>B. mucilaginosus</i> KU5, n=4									
X	11.4	4.5*	6.3	23.2	2.5	1	18.75	76.25	1.75
m	0.77	1	0.35	3.5	1.5	0.41	2.84	2.4	0.48
7. Три месяца приема <i>B. mucilaginosus</i> KU5, n=4									
X	10.9	5.25	6.5	20.5	4.75	2	32.75*	59*	1.5
m	0.58	1.79	0.35	1.81	1.25	0.41	4.75	4.1	0.29
8. Месяц приема <i>B. mucilaginosus</i> KU6, n=5									
X	10.4	3.4*	6.36	21.63	5.43*	0.8	29.4*	63*	1.4
m	0.3	0.6	0.17	2.5	0.81	0.2	3.59	3.36	0.4
9. Три месяца приема <i>B. mucilaginosus</i> KU6, n=5									
X	10.35	4.75	6.65	19.98	5.5*	1.25	23.25	67.25	2.75
m	0.1	0.48	0.13	2.9	0.5	0.48	4.1	5.6	1.38
10. Месяц приема <i>B. subtilis</i> 168M, n=4									
X	10.6	2.3	6.1	21.6	3.7	1	17.3	76.75	1.33
m	0.7	0.88	0.12	2.1	1.3	0.58	4.1	3.8	1.33
11. Три месяца приема <i>B. subtilis</i> 168M, n=4									
X	11.5	2.7	6.9	20.1	5.3*	1.67	21.3	74	1.0*
m	0.29	0.32	0.18	1.75	0.3	0.33	3.8	6.66	0

Примечание: X- среднее арифметическое значение признака, значимые отличия обозначены знаком "*", m- ошибка среднего; Hb- уровень гемоглобина, COЭ- скорость оседания эритроцитов, Er- количество эритроцитов, Lei- количество лейкоцитов в крови. Лейкоформула включает процентное содержание эозинофилов, палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов.

Таблица 7

Влияние бактериальных обработок на некоторые
количественные признаки *Pisum sativum*

Параметры	Контроль	<i>B. oligonitrophilus</i> KU1	<i>B. mucilaginosus</i> KU5
<i>Сорт Казанец, высота</i>			
$X \pm m$	41.4 \pm 0.71	40.1 \pm 0.8*	37 \pm 1.2*
<i>Сорт Татарстан, высота</i>			
$X \pm m$	60.6 \pm 1.18	54.2 \pm 1.5*	55.7 \pm 0.8*
<i>Сорт Адыгейский, высота</i>			
$X \pm m$	74.3 \pm 2.43	71.2 \pm 1.62	71.25 \pm 1.94
<i>Сорт Казанец, количество междоузлий</i>			
$X \pm m$	15.3 \pm 0.2	16 \pm 0.14*	15.6 \pm 0.14
<i>Сорт Татарстан, количество междоузлий</i>			
$X \pm m$	11.9 \pm 0.2	12.5 \pm 0.23	13.3 \pm 0.16*
<i>Сорт Адыгейский, количество междоузлий</i>			
$X \pm m$	12 \pm 0.21	11.5 \pm 0.15	11.6 \pm 0.18
<i>Урожайность, сорт Казанец</i>			
$X(10)$	1.78 \pm 0.04	1.76 \pm 0.003	1.38 \pm 0.003*
Ns	2.1 \pm 0.1	4 \pm 0.27	4.05 \pm 0.18*
Nb	3 \pm 0.13	2.74 \pm 0.15	2.74 \pm 0.11
min - max	8.85 - 13.9	14.9 - 27.2*	12.4 - 18.3
<i>Урожайность, сорт Татарстан</i>			
$X(10)$	1.95 \pm 0.04	1.68 \pm 0.003*	1.7 \pm 0.002*
Ns	3.9 \pm 0.15	4.3 \pm 0.26*	3.8 \pm 0.19
Nb	4.3 \pm 0.18	2.5 \pm 0.14*	3.52 \pm 0.16*
min - max	25.7 - 39.5	13.3 - 22.7*	18 - 28.8
<i>Урожайность, сорт Адыгейский</i>			
$X(10)$	5.9 \pm 0.7	5.3 \pm 0.4	6.2 \pm 0.51
Ns	3.9 \pm 0.18	3.7 \pm 0.15	4 \pm 0.15
Nb	3.3 \pm 0.38	3.9 \pm 0.21	3.5 \pm 0.24
min - max	4.3 - 12.4	5.4 - 10.5	5.8 - 12.4

Примечание: X - среднее значение, m - ошибка среднего, $X(10)$ - средний вес 10 семян, Ns - среднее количество семян в бобе, Nb - среднее количество бобов на растении; достоверность отличий посчитана по критериям Стьюдента и Холмогорова-Смирнова для $P < 0.05$, значимые отличия выделены курсивом, min - max - интервальные оценки урожайности по произведению всех трех параметров, гр.

Отсутствие устойчивого влияния бактериальных препаратов (в том числе и силикатных) на урожайность сельскохозяйственных культур отмечается рядом авторов (Мишустин и др., 1981). Лучший эффект по прибавке урожайности дает метод бактериализации растений и почвы бактериальной культурой, при этом показано, что штаммы *B. mucilaginosus* успешно колонизируют ризосферу (Гороховский, 1958).

Ряд мелкоделяночных экспериментов по влиянию бактериальных обработок (10% суспензия штаммов *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KUS) на варьирование количественных признаков у гороха показал увеличение числа междоузлий для сортов Казанец и Татарстан по сравнению с контролем (табл. 7). Количество междоузлий гороха контролируется несколькими неаллельными генами, локализованными в 1, 5, 7 хромосомах гороха (Хвостова, 1975). Признак является сортоспецифическим. Увеличение числа междоузлий является следствием активности апекса побега, которая контролируется, в свою очередь, фитогормонами.

Увеличение урожайности сорта Казанец произошло за счет увеличения количества семян в бобе. Урожайность контролируется системой аддитивных генов, особенностью проявления которых является неполная пенетрантность и варьирующая экспрессивность, т.е. зависимость от условий среды, в нашем случае - бактериальных обработок. Для сорта Татарстан показано снижение урожайности за счет снижения количества бобов на растении. У сорта Адыгейского достоверных отличий не обнаружено.

Горох, в отличие от злаков, является самоопылителем, генетическая составляющая паратипической вариации приравнивается к нулю, отличия между выборками обуславливаются средовыми факторами, в нашем случае бактериальными препаратами.

В 1999г. нами было высеяно семенное потомство растений гречихи (от урожая 1998г., обработанных бактериями). Во всех вариантах найдены растения с фасциациями узлов и междоузлий, но только в опытных были растения, содержащие оба типа фасциаций на одном растении. Поскольку их частота существенно не отличалась от теоретически рассчитанной (при условии независимости событий), предполагается, что данные два типа фасциаций происходят независимо друг от друга. Высев семенного потомства растений, имеющих фасциации обоих типов и анализ растений второго поколения показал у них достаточное превышение над контролем по ряду количественных признаков.

Индукция морфозов (типа атавизмов и фасциаций), задержки цветения, клубне- луковичеобразования под действием силикатных бактерий наблюдалась у представителей ряда семейств цветковых растений.

Морфозы типа атавизмов представляли собой видоизменения репродуктивных органов. У сложноцветных (фото1-2) - *Cosmos bipinnatus* Cav., *Calendula officinalis* L. они представляли собой лепестковидные образования и гинецееподобные структуры краевых цветков корзинки. Данные варианты соцветий у космеи наблюдались с частотой около 10% в первом поколении. При дальнейших обработках, во втором поколении, частота их появления возросла до 30-40%, и составила к третьему поколению 90-95% от исследованной популяции. Растения *Plantago major* L. имели сильно разросшиеся листовидные прицветники (фото 8). Садовая земляника (*Fragaria magna* Thuill.) дала при цветении массовое образование лепестковидных тычинок.

Помимо вышеприведенных морфозов у растений, подвергнутых интенсивным бактериальным обработкам, мы наблюдали образование разных типов фасциаций (фото 3-7). Фасциации наблюдались у представителей семейства тыквенных (огурцы, кабачки), розоцветных (земляника, малина), гречишных (гречиха посевная), сложноцветных (календула, космея), лилейных (лилия белая садовая) и др. Этот тип морфозов возникал у растений при обработке их суспензиями с титром 10^7 клеток/мл. Частота встречаемости фасциаций варьировала в зависимости от вида растения и вида фасциации: 1-5% у календулы, до 5% у *Delphinium*, 5-8% у земляники, до 5% у космеи (только под действием штамма *B.mucilaginosus KU5*). У дикорастущей адвентивной *полыни Сиверса* (*Artemisia sieversiana Willd.*) фасциации возникали лишь при обработках не разведенной бактериальной суспензией (10^9 клеток/мл). В семенном потомстве гречихи частота стеблевых фасциаций достигала 44%.

Образование данных морфозов мы объясняем исходя из предложенной гипотезы ювенилизации генома и роли биологически активного кремния в поддержании определенных конформационных состояний ДНК хромосом и, соответственно, активации и инактивации тех или иных ансамблей генов. Мы считаем, что в процессе онтогенетического развития конформационные состояния ДНК хромосом меняются за счет невосполнимых потерь кремния. Усиление процессов витаукта за счет повышения во внешней среде биологически активного кремния (в нашем случае за счет бактериальных обработок), может приводить к замедлению процесса невосполнимых потерь кремния из хромосом. Это ведет к замедлению процессов изменения конформационных состояний ДНК хромосом и соответственно работающих генов. Гетерохрония в процессах замедления онтогенетического развития различных зачатков и может являться причиной отмеченных выше атаксизмов у растений.

И в наших опытах, и по данным литературы (Мишустин и др., 1981) замечено увеличение количества цветов и плодов у различных растений под действием силикат разрушающих бактерий на 10 - 100%. По-видимому, с определенной частотой (у нас 1 - 5%) увеличение числа заложённых почек происходит по месту, где почка уже заложена. Визуально это наблюдается как возникновение фасциаций цветоноса. В большинстве случаев у изученных нами растений это приводит к нормальному цветению, плодоношению и созреванию фасцированных образований.

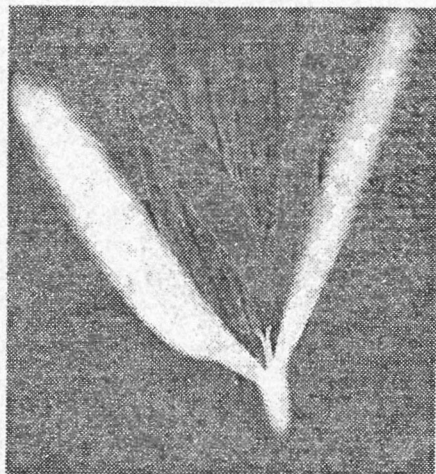


Фото 1 Дополнительные лепестковидные образования и гинееподобная структура краевого цветка *Cosmos bipinatus*

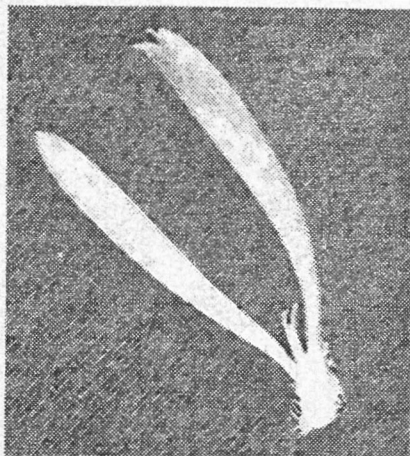


Фото 2 Краевой цветок корзинки с дополнительным лепестковидным образованием у *Calendula officinalis*



Фото 3 Фасциация цветоносного побега у лилии



Фото 4 Фасциация цветоносного побега у *Delphinium sativum*.



Фото 5 Фасциация цветоносного побега у лилии

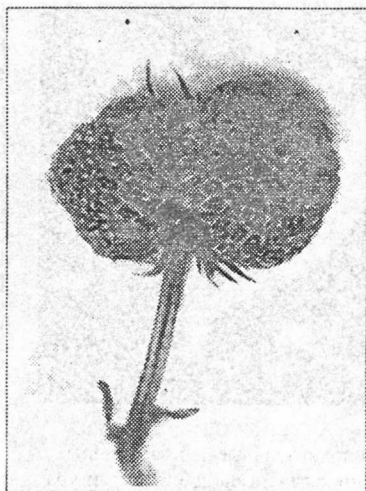


Фото 6 Фасциация плода у клубники *Fragaria magna*



Фото 7 Фасциации корзинки у *Calendula officinalis*



Фото 8 Увеличенные лепестки цветоносного побега *Plantago major*

4. Гипосенсибилизирующий эффект обработок растений штаммом *B. oligonitrophilus* KU1

В течение ряда лет на территории биостанции КГУ, на близлежащем дачном участке проводились обработки плодово-ягодных, зерновых и овощных культур суспензионными культурами *B. oligonitrophilus* KU1. Растениям создавались условия, близкие к оптимальным по водному и световому режиму; химические препараты не применялись.

Снижение величин аллерготестов (табл 8) показано для: ягодных культур - вишни (сорт Владимирская), смородины черной (сорт память Мичурина), смородины красной (сорт Веллингтон 30), крыжовника (сорт финик красный), земляники садовой (сорта Анапасская, Рошинская, Зенга-Зенгана, Талисман, Шведская ранняя); яблок сорта "Зорянка"; огурцов (сорта Родничок, Вязниковские) и томатов (сорта Дебаро, Бабушка, Бычье сердце); свеклы (сорт Бордо), моркови (сорт Нантская), картофеля (сорта Сантэ, Аноста).

Таким образом, наблюдалось снижение сенсибилизирующей активности продуктов под действием обработок штаммом *B. oligonitrophilus* KU1.

Снижение аллергенности может быть связано со снижением экспрессии соответствующих аллергенных начал. На это указывает более низкое значение РДТК проб крови больных в опытных вариантах, чем в контрольных. На это же указывало и более выраженное снижение в тестах ОПТ и ОПП, по сравнению с КСП и Прик-тестом. Остается открытым вопрос, что именно изменяется под действием бактерий: количество аллергенов или же они определенным образом модифицируются.

Для определения наиболее аллергенных начал мы проводили фракционирование свеклы.

Наибольший уровень аллергенности показан для "не белковой" фракции. Следует отметить, что аллергенность компонентов этой фракции, в частности свекольного сахара достаточно распространена. Вероятно, молекулы данной фракции являются лигандами аллергических реакций.

Усиление сенсибилизирующей активности по КСП наблюдалось для всех фракций, кроме альбуминовой (табл. 9). По ОПТ наблюдалось значимое падение аллергенной активности глобулиновой и "не белковой" фракций. По РДТК наблюдалось снижение сенсибилизации для "не белковой", белковой и глобулиновой фракций.

Снижение аллергенной активности глобулиновой фракции свеклы, обработанной штаммом *B. oligonitrophilus* KU1, связано, как мы считаем, со снижением экспрессии защитных белков типа *Bei v1*. Это снижение может быть обусловлено угнетением роста болезнетворной микрофлоры данным штаммом, подачей растениям определенных биологически активных веществ, возможно содержащих кремний. Снижение сенсибилизирующей активности "не белковой" фракции можно объяснить как снижением количества наиболее агрессивных компонентов этой фракции, так и наличием низкомолекулярных метаболитов, являющихся модуляторами иммунной системы человека.

Мы считаем, что подобное снижение сенсibilизирующей активности под действием интенсивных бактериальных обработок штаммом *B. oligonitrophilus* KU1 обязано, по крайней мере, частично, способности данного штамма разрушать силикаты и переводить кремний в биологически- активную форму, которая утилизируется растениями. Для выделенных позднее штаммов, обозначенных нами как KU5, KU6 и определенных как *B. mucilaginosus*, предполагается наличие подобной активности. Проведенный анализ позволяет говорить о сходстве штаммов KU1 и KU5, рекомендуя использовать их в качестве гипосенсибилизирующих агентов для растений. Учитывая сенсibilизирующий эффект штамма *B. mucilaginosus* KU6, показанный на крысах, рекомендовать его к применению нужно с осторожностью.

Таким образом, мы предлагаем следующий путь выделения штаммов силикатных бактерий, обладающих гипосенсибилизирующим действием на сельскохозяйственные растения.

Таблица 8

Значения аллeрготестов тестируемых продуктов

Тесты	Контроль			Опыт			td
	n	абс.	% + m	n	абс.	% + m	
Ягодные культуры (земляника, вишня, смородина)							
КСП	136	136	100+0	133	98	73.7+3.8	6.8*
Прик-т	137	120	87.6+2.8	136	89	65.4+4.1	4.5*
РДТК	137	50	36.5+4.1	123	14	11.4+2.9	5*
ОПТ	137	42	30.7+3.9	135	13	9.6+2.5	4.5*
Яблоки, сорт "Зорянка"							
КСП	30	28	93.3+4.6	30	12	40+8.9	5.3*
Прик-т	30	22	73.3+8.1	30	11	36.7+8.8	3.1*
РДТК	24	18	75+8.8	25	10	40+9.8	2.7*
ОПТ	30	14	46.7+9.1	30	8	26.7+8.9	1.3
Помидоры и огурцы							
КСП	54	43	79.6+5.5	54	31	57.4+6.7	2.6*
Прик-т	54	43	79.6+5.5	54	26	48.2+6.8	3.6*
РДТК	54	18	33.3+6.4	52	14	26.9+6.1	0.7
ОПТ	54	26	48.2+6.8	54	9	16.7+5.1	3.7*
Корнеплоды (морковь, свекла, картофель)							
КСП	154	72	46.8+4	146	73	50+4.1	0.6
Прик-т	154	89	57.8+3.9	145	62	42.8+4.1	2.6*
РДТК	154	89	57.8+3.9	143	69	48.3+4.2	1.6
ОПТ	154	91	59.1+4	149	7	4.7+1.7	12.6*

Примечания: первая колонка - названия аллeргологических тестов, n- количество исследованных больных, абс.- число чувствительных людей, % + m - доля чувствительных пациентов со своей ошибкой, td - оценка доли по Стьюденту для альтернативных вариантов, значимые отличия выделены.

Таблица 9

Значения аллерготестов фракций свеклы

Аллерго-тесты	n	экстракт	не белковая	белки	альбумины	глобулины
<i>Контроль</i>						
КСП	28	55.6+11.7	61.1+11.5	33.3+11.1	66.7+11.1	50+11.8
РДТК	18	64.3+9.1	92.9+4.9	53.6+9.4	64.3+9.1	57.1+9.4
ОПТ	28	55.6+9.6	77.8+8	25.9+8.4	25.9+8.4	51.9+9.6
<i>Опыт</i>						
КСП	24	91.7+5.6*	95.8+4.1*	91.6+5.6*	79.2+8.6	83.3+7.6*
РДТК	25	52+9.9	48+9.9*	20+8.9*	64+9.6	36+9.6*
ОПТ	25	32+9.3	48+9.9*	28+8.9	32+9.3	20+8*

Примечание: значимые отличия между фракциями контроля и опыта по Стьюденту выделены знаком "*", n - общее количество исследованных больных, данные представлены в виде процента положительных результатов тестов со своей ошибкой.

1. Выделение штаммов "силикатных бактерий" по методике Александрова.

2. Отбор среди выделенных штаммов на отсутствие токсических и генотоксических эффектов по отношению к ряду лабораторных штаммов, способность выделять в среду тимин, пурины, никотиновую кислоту.

4. Далее отбор штаммов, не обладающих токсичностью в ряде тестов на животных и растениях.

5. Индукция морфозов на ряде растений разных семейств, как-то: появление дополнительных лепестковидных образований с гинееподобными структурами на краевых цветках корзинки сложноцветных (*Cosmos bipinnatus Cav.*); усиление окраски лепестков венчика у космеи; у подорожника большого образование в нижней части соцветий листовидных прицветников; у садовой земляники образование лепестковидных тычинок; у топинамбура, гладиолусов и адониса летнего - задержки цветения, луковиче и клубнеобразования. У целого ряда растений (тыквенные, гречишные, сложноцветные, лилейные) появление фасцированных (сдвоенные) стеблей, цветов и плодов.

Практические рекомендации. Гипосенсибилизирующий эффект, показанный на ряде важных сельскохозяйственных растений, можно использовать для получения продуктов с пониженной аллергенной активностью, предназначенных к употреблению в первую очередь аллергиками.

Предложен механизм поиска и отбора штаммов, обладающих гипосенсибилизирующим действием при инокуляциях ими сельскохозяйственных растений. Штамм *B. oligonitrophilus KUI* можно рекомендовать как гипосенсибилизирующий.

ВЫВОДЫ

1. Из почв РТ РФ выделены три штамма бацилл, классифицированных как: *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5, *B. mucilaginosus* KU6, разрушающие силикаты и стимулирующие рост ауксотрофных по тимину, пуринам, никотиновой кислоте штаммов *B. subtilis*.

2. Для культур данных штаммов показано:

- отсутствие токсического и генотоксического действия культуральных жидкостей штаммов в тесте Эймса;
- отсутствие токсического и генотоксического действия при анализе митотической активности, учете хромосомных aberrаций в клетках корешков лука и скерды;
- токсикологическая безопасность на дафниях;
- отсутствие токсического действия культур *B. oligonitrophilus* KU1, *B. mucilaginosus* KU5, на крыс и слабый токсический (сенсibiliзирующий) эффект штамма *B. mucilaginosus* KU6;
- отсутствие токсического и генотоксического действия штаммов на дрозофилу.

3. При интенсивных обработках силикатными бактериями показана индукция морфозов (типа фасциаций и атавизмов) для различных цветковых растений.

4. Обнаружено гипосенсибилизирующее действие обработок штаммом *B. oligonitrophilus* KU1 на ряде сельскохозяйственных растений: землянике, вишне, смородине, яблоках, помидорах и огурцах, моркови, свекле, картофеле.

Публикации по теме диссертации.

1. Полозов Г.Ю. Сравнительное изучение некоторых свойств лабораторного штамма *B. subtilis* 168М и бацилл, выделенных из почвы.// Деп. в ВИНТИ, 18.11.96., 3351-В96. Казань, КГУ, 1996. 7С. УДК 579.64: 631.46
2. Малков С.В., Барабанщиков Б.И., Ситников А.П., Полозов Г.Ю. Возникновение атаксизмов и фасциаций у растений под действием силикатразрушающих бактерий.// Деп. в ВИНТИ, 26.06.97 2077-В97. Казань, КГУ, 1997, 12С. УДК 579.64: 631.46
3. Ситников А.П., Полозов Г.Ю., Малков С.В. Спектры изменчивости меристических признаков цветка у двух видов *Fagopyrum* Mill.//История, опыт работы и перспективы развития естественно- географического факультета. Материалы научно- практической конференции посвященной 80- летию образования ЕГФ. Часть 2. Казань. - 1998.- С.85- 86.
4. Полозов Г.Ю., Малков С.В. Биологическое действие силикатразрушающих бактерий на растительные и животные объекты. // Тезисы докладов 3 Республиканской научно- технической конференции молодых ученых и специалистов. Казань. - 1997.- С.53
5. Полозов Г.Ю., Вагин Д.А. Влияние бактериальных обработок на морфофизиологические признаки гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum*) // Тезисы докладов 4 Съезда «общества физиологов растений». Москва, 4-9 окт. 1999.- Т.1.- М.: 1999. – с. 236-237.
6. Малков С.В., Потемкина А.М., Полозов Г.Ю., Барабанщиков Б.И. Гипосенсибилизирующий эффект силикатных бактерий // Научно – практическая конференция « Биотехнология 2000». Багдел «биотехнология для медицины». Пушино, 26-30 сентября 2000. (в печати).
7. Полозов Г.Ю., Малков С.В., Барабанщиков Б.И. Действие силикатразрушающих бактерий на морфофизиологические признаки растений. Сообщение 1. Влияние силикатных бактерий на количественные признаки // Нива Татарстана. – 2000, №5. – с.14-17.
8. Малков С.В., Полозов Г.Ю., Барабанщиков Б.И. Действие силикатразрушающих бактерий на морфофизиологические признаки растений. Сообщение 2. Морфогенетическое действие силикатных бактерий // Нива Татарстана. – 2000, №6. (в печати).
9. Малков С.В., Полозов Г.Ю., Потемкина А.М., Барабанщиков Б.И. Действие силикатразрушающих бактерий на морфофизиологические признаки растений. Сообщение 3. Гипосенсибилизирующий эффект бактериальных инокуляций // Нива Татарстана. – 2000, №6. (в печати).

Подписано в печать 20.10.2000. Формат 60/84/16.
Усл. печ. л. 1,5. Договор № 25. Тираж 100.

Лаборатория оперативной печати ТГГИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373

